



(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 39/395 (2006.01) **C07K 16/02** (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/IB20 14/064028

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de agosto de 2014 (22.08.2014)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante: **IDISA INNOVACION, S.A. DE C.V.**
[MX/MX]; Calle 7 Norte No. 416, Col. Centro., Tehuacán,
Puebla., 75700 (MX).

(72) Inventores: **LUCIO DECANINI, Eduardo;** Retorno
Miguel de Cervantes #103, Fraccionamiento El Molino,
Tehuacán, Puebla., 75741 (MX). **MORALES GARZON,**
José, Andrés; 18 de Marzo # 108, Col. Electricistas.,
Tehuacán, Puebla, 75741 (MX).

(74) Mandatario: **MIER Y CONCHA SEGURA, Jorge;**
Insurgentes Sur 1605- Piso 20, Col. San José Insurgentes,
México D.F., 03900 (MX).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,

AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE,
KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY,
MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA,
NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO,
RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV,
SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible):
ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW,
SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ,
BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: EMULSIFIED VACCINE TO OBTAIN FORMULATIONS OF CONCENTRATED IGY IMMUNOGLOBULINS;
PROCESSES AND USES FOR THE SAME.

(54) Título : VACUNA EMULSIONADA PARA OBTENER FORMULACIONES DE INMUNOGLOBULINAS IgY
CONCENTRADAS; PROCESOS Y USOS DE LAS MISMAS.

(57) Abstract: The present invention relates to a therapy for the treatment or prevention of diverse diseases in animáis, based on the
administration of a formulafion of highly concentrated immunoglobulins of avian origin obtained from egg yolk from hens
previously hyperimmunised with a vaccine formulation comprising antigens of infectious agents or toxins, a light mineral oil and a
particulate adjuvant.

(57) Resumen: La presente invención se relaciona con una terapia para el tratamiento o prevención de diversas enfermedades en
animales, con base en la administración de una formulación de inmunoglobulinas altamente concentradas de origen aviar, obtenida
de la yema de huevo proveniente de gallinas hiperinmunizadas previamente con una formulación de vacuna que comprende
antígenos de agentes infecciosos o toxinas, un aceite mineral ligero y un adyuvante particulado.



**VACUNA EMULSIONADA PARA OBTENER FORMULACIONES DE
INMUNOGLOBULINAS IgY CONCENTRADAS; PROCESOS Y USOS DE LAS
MISMAS .**

5 **CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se relaciona con el campo de la medicina veterinaria, en particular con el tratamiento de enfermedades en animales, y más específicamente con la
10 prevención o tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo o PRRS (por las siglas del Inglés, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) en los porcinos, la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las
15 infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, las coccidiosis en aves y las intoxicaciones producidas por toxinas de los hongos, mediante la administración de una formulación de inmunoglobulinas concentrada de origen aviar, obtenida de
20 yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas con una formulación de vacuna emulsionada que comprende antígenos, un aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que consiste en partículas de un polímero biodegradable.

25

ANTECEDENTES

La sanidad de los animales es la clave principal para obtener alimentos sanos y de calidad. Es por ello
30 que el control de las enfermedades y el empleo de todas las herramientas disponibles para ello resulta ser de suma importancia. La vacunación es una herramienta más de las muchas que se emplean diariamente en las granjas,

existiendo otras como medidas de bioseguridad para evitar la entrada de patógenos provenientes de otras explotaciones, la aplicación de pautas de higiene y el manejo de los animales para reducir la diseminación de enfermedades entre los animales de la misma explotación, control estricto de la alimentación, o la creación de un ambiente confortable para los animales de la granja.

No obstante a la fecha existen enfermedades que no ha sido posible controlar de manera adecuada. Dentro de estas enfermedades se encuentran las producidas por los virus, tal como la ocasionada por el virus del Síndrome Respiratorio y Reproductivo del Cerdo, que es una enfermedad severa en los porcinos, la cual fue reportada en los Estados Unidos en 1987 y posteriormente se identificó en muchos otros países europeos. En 1991, en Holanda se reportó el aislamiento del agente etiológico llamándole virus Lelystad y debido a la sintomatología que presentaban los cerdos se le conocía como Síndrome Respiratorio y/o Aborto Epidémico del Cerdo.

Otra enfermedad viral que no ha sido posible controlar es la Diarrea Epidémica Porcina (PED), la cual es una enfermedad viral exclusiva de los porcinos, muy contagiosa y en la mayoría de las veces ocasiona la muerte. Esta enfermedad afecta el sistema digestivo y los lechones mueren en un periodo de 3-5 días a causa de la diarrea y deshidratación .

Otra enfermedad más es la ocasionada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV), principal patógeno del camarón y responsable de grandes pérdidas de producción y ganancias en esta industria a nivel mundial. Hasta ahora no existe ningún tratamiento efectivo para controlar la infección.

El tratamiento de las enfermedades causadas por *coronavirus* y *rotavirus* bovino también resulta de interés .

Por otra parte encontramos las enfermedades
5 ocasionadas por bacterias, tal como la mastitis bovina que produce una inflamación de la glándula mamaria y sus tejidos secretores, reduciendo la producción del volumen de leche y alterando su composición, e incluso su sabor, además de elevar su carga bacteriana normal. De acuerdo
10 con su duración, se puede clasificar en aguda o crónica. En relación a sus manifestaciones clínicas, puede ser clínica o subclínica. Esta enfermedad provoca graves pérdidas económicas a la industria lechera.

También encontramos las enfermedades provocadas por
15 el *Actinobacillus pleuropneumoniae*, bacteria responsable de problemas respiratorios en porcinos con distribución mundial, conociéndose desde hace 50 años, y teniendo una elevada incidencia desde los años 80, siendo frecuente en unidades de engorde. Responsable primario de la
20 Pleuroneumonía porcina, así como agente involucrado directamente dentro del Complejo Respiratorio Porcino. Es una enfermedad de elevada diseminación, altamente contagiosa y en muchas ocasiones letal en porcinos desde el destete al sacrificio. Provoca en el 30-50% de los
25 porcinos una pleuritis fibrinosa con adherencias costales bastante características y elevada mortalidad en cuadros agudos, con elevado retraso del crecimiento en las formas crónicas. Además se ha encontrado que el *Actinobacillus pleuropneumoniae* está involucrado en cuadros de otitis
30 media, artritis y osteomielitis.

El tratamiento de las enfermedades causadas por *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Clostridium perfringens* también es de interés para la salud de los animales .

Por otra parte, tenemos la coccidiosis que es una enfermedad infecciosa producida por parásitos de vida intracelular estricta de los géneros *Eimeria* spp. e *Isospora* spp. Las coccidias son omnipresentes pues
5 existen en la mayoría de las instalaciones pecuarias alrededor del mundo. Estos parásitos pueden infectar a una gran variedad de animales incluyendo humanos, aves, rumiantes, cerdos, perros, gatos y otros animales domésticos, sin embargo, en la mayoría de los casos las
10 coccidias son especies específicas.

Adicionalmente otro problema de salud que enfrenta la industria pecuaria son las ocasionadas por tricotecenos, toxinas producidas por varios hongos *Fusarium*, particularmente *Fusarium graminearum* y *Fusarium sporotrichioides*. Se producen en cosechas y entran al
15 alimento a través de ingredientes contaminados. Los Tricotecenos son irritantes tisulares comprobados y su ingesta se asocia principalmente con lesiones orales, dermatitis e irritación intestinal. La principal
20 respuesta fisiológica a estas micotoxinas es la pérdida del apetito. Los tricotecenos son micotoxinas supresoras fuertes que afectan la respuesta celular inmune con un impacto directo sobre la médula, el bazo, los tejidos linfoides, el timo y la mucosa intestinal, en donde se
25 lesionan las células que se dividen activamente.

Para el control preventivo de todas estas enfermedades, existen básicamente dos formas de protección. Se les puede exponer a antígenos derivados de un agente infeccioso para estimular una reacción
30 inmunitaria protectora o bien se les puede administrar un anticuerpo preformado que se haya obtenido de algún sujeto inmune.

La primera forma de protección se logra por medio de vacunas que pueden ser de diferentes clases: microorganismos vivos, liofilizados, o muertos en emulsiones oleosas, y recientemente la creación de vacunas clonadas y recombinantes. Cada una de ellas presenta ventajas y desventajas en cuanto a protección, respuesta inmune y duración de la protección. Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos se presentan lesiones indeseadas en el huésped a causa del virus vacunal {Tizará, I.R. 1998. *Vacunación y vacunas* In: *Inmunología Veterinaria*. 5ª Ed. Me. Graw-Hill. Pp. 285-305) .

La segunda forma de protección también llamada inmunidad pasiva involucra la transmisión de anticuerpos específicos contra agentes infecciosos a un huésped.

Tradicionalmente, a nivel de investigación, los anticuerpos son elaborados principalmente en mamíferos y en menor frecuencia en aves. Los tipos de anticuerpos que regularmente se elaboran en mamíferos son monoclonales y policlonales, y policlonales en aves {Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies : taking advantage of evolution . A review Poultry Sci.*72: 1807-1812) .

En el caso de las aves, la especie *Gallus gallus domesticus* (gallos y gallinas) es la única especie de la cual se obtienen anticuerpos en forma más accesible y de manera altamente definida. El principal anticuerpo sérico presente en dicha especie es la IgG aunque la IgG es transportada al huevo de una manera similar a la transferencia de la IgG de mamíferos a través de la placenta.

En el huevo, la inmunoglobulina Y (IgY) se encuentra en mayor concentración en la yema, no obstante también se encuentran pequeñas cantidades de IgY en la clara.

Incluso se ha encontrado que las cantidades de IgY son mayores en la yema que en el suero de la gallina {Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies : taking advantage of evolution. A review Poultry Sel.* 12: 1807-1812) .

Para tener una noción de la cantidad de anticuerpos que elaboran las gallinas, basta señalar que una ponedora produce aproximadamente de 5 a 6 huevos por semana con un volumen de yema de aproximadamente de 15 mi, por lo tanto, en una semana una gallina puede llegar a producir anticuerpos en yema equivalente a 90 a 100 mi de suero o 180 a 200 mi de sangre completa. Esto al compararse contra los 20 mi de sangre completa que otorga un conejo inmunizado por semana permite apreciar claramente la eficiente productividad de los anticuerpos en yema de huevo. Obviamente si se utilizan animales más grandes como caballos o vacas, la cantidad de suero y de anticuerpos seria mayor que en el huevo, pero además de que el procedimiento es costoso también es más doloroso para los animales.

Entre las ventajas de los anticuerpos de yema de huevo de gallina se encuentran:

1. No fijan el complemento.
2. No se unen a la Proteína A de *Staphílococcus aureus*.
3. No reacciona con el Factor Reumatoide.
4. Debido a su diferencia filogenética con los anticuerpos de mamíferos, la IgY no muestra reacción cruzada con los anticuerpos de mamíferos.
5. Bajo costo de obtención.

En años recientes se han empleado los anticuerpos de yema de huevo (inmunoglobulinas) como herramientas de diagnóstico y terapia (Schmidt, et al. 1989) . Es así que

aprovechando su diferencia filogenética con las inmunoglobulinas de mamíferos, las Ig's han presentado varias ventajas cuando se han usado en inmunodiagnóstico. Por ejemplo, las Ig's de yema se han empleado para
5 detectar varios virus mediante las técnicas de ELISA, inmunodifusión, inmunofluorescencia y fijación de complemento. Dado su bajo punto isoeléctrico comparado con la Ig de humanos, se ha empleado en ensayos de electroforesis para la cuantificación de inmunoglobulinas
10 en suero de varios animales {Altschuh, D. et al. 1984. *Determinación of IgG and IgM levels in serum by Rocket Immunelectrophoresis using yolk antibodies from immunized chickens*. J. Immunol. Methods. 69:1-7; Larsson, A. et al. 1988. *Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests*. J. Immunol. Methods. 108:205-208; Larsson, A. et al. 1992. *Chicken antibodies: a tool to avoid interference by complement activation in ELISA*. J. Immunol. Methods. 156: 79-83.; Larsson, et al 1993.
20 *Chicken antibodies: taking advantage of evolution. A review Poultry Sci.* 72: 1807-1812; Schade, R. et al 1996. *The production of avian (Egg yolk) antibodies: IgY*. *Atla*. 24: 925-934).

En cuanto a su aplicación terapéutica, las IgY se
25 han empleado como inmunoterapia en diferentes campos de la ciencia como por ejemplo la administración de inmunoglobulinas de yema de huevo por vía oral ha prevenido infecciones por rotavirus en ratones, bovinos, y porcinos entre otros {Ikemori, Y. et al. 1992.
30 *Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* 53:2005-2008; Kuroki, M.

et al 1994. *Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk*. Arch. Virol. 138: 143-148; Marquart, R. 1998. *Antibody-loaded eggs for piglets : prevention of baby pigs from diarrhea*. Proc. 2nd International Symposium on Egg Nutrition and Newly Emerging Ovo-Technologies . Alberta , Canadá) .

Incluso las inmunoglobulinas IgY de yema de huevo se han empleado como antivenenos contra víboras y
10 escorpiones los cuales se pueden inyectar para neutralizar las toxinas sin riesgo de las reacciones anafilácticas comunes encontradas con los antivenenos elaborados en caballo {Larsson, et al 1993. *Chicken antibodies : taking advantage of evolution* . A review
15 *Poultry Sci.* 72: 1807-1812) . Una aplicación más ha sido para prevenir la caries en humanos provocada por *Streptococcus mutans* {Hatta, H. et al. 1997. *Passive immunization Against Dental Plaque Formation in Humans : Effect of a Mouth Rinse containing Egg Yolk Antibodies*
20 (IgY) *Specific to Streptococcus mutans*. *Caries. Res.* 31: 268-274) .

En el caso de las enfermedades en animales antes mencionadas, a lo largo del tiempo se han desarrollado numerosas medidas de control y prevención debido a la
25 extensión y repercusión económica de dichas enfermedades . Entre las estrategias para combatirlas se encuentran las vacunas inactivadas y las vacunas a virus vivo . Sin embargo, ninguna de estas estrategias ha sido 100% eficaz .

30 En el caso específico de los virus de RNA como el virus del PRRS o el virus de PED la falta de control se debe en gran parte a su alto índice de mutación. Esta es una característica en común entre los virus de RNA a

consecuencia de la falta de actividad de *proofreading* de la RNA polimerasa. Entonces, esta falla junto con la rápida cinética de replicación del virus incrementan el riesgo de mutación y surgimiento de cuasiespecies (Manreetpal Singh Brar, Mang Shi, Raymond Kin-Hi Hui and Frederick Chi-Ching (2014) Leung mail Genomic Evolution of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Isolates Revealed by Deep Sequencing. PLOS one) . Se ha reportado que la variación genética del virus de PRRS es entre 0.48 y 1.32 % (Murtaugh M., (2012) Use and interpretation of sequencing inf PRRSV control programs . Alien D. Leman Swaine Conference . Veterinary Continuing Education) . Estas características del virus de PRRS explican la inadecuada protección que se ha obtenido por vacunas .

Una de las estrategias que se ha utilizado para prevenir las enfermedades ocasionadas por estos virus son las autovacunas, lo cual implica desarrollar vacunas no sólo por país, sino por regiones, de lo contrario la prevención por estos medios resulta ser insuficiente.

También se ha observado que en el caso del virus causante del PRRS se logra neutralizar utilizando inmunoglobulinas provenientes del suero de mamífero (US 5,846,805). Estos resultados enseñan que las inmunoglobulinas son una alternativa para el tratamiento de virus de RNA. Sin embargo, el problema con esta alternativa es que los anticuerpos obtenidos de esta manera son inviables.

La aplicación de inmunoglobulinas obtenidas a partir de la yema de huevo (IgY) ya ha sido utilizada en diversas aplicaciones en salud y profilaxis animal e incluso en humanos . Las investigaciones realizadas por Akita y Nakai (Akita, E., Nakai, S. (2000). *Egg nutrition*

and biotechnology , CAB International, New York, p.301),
demuestran que la función protectora de IgY contra
agentes infecciosos es atribuida principalmente por su
capacidad para prevenir la colonización o neutralizar las
5 toxinas .

Por lo anterior, un objetivo de la presente
invención se refiere a la obtención de formulaciones de
inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar,
efectivas y seguras contra diversos agentes que infectan
10 a los animales, incluyendo por ejemplo el virus PRRS, el
virus de la Diarrea Epidémica Porcina (DEP), el virus
White Spot Syndrome Baculovirus Complex, las bacterias
que provocan la mastitis bovina, el *Actinobacillus*
pleuropneumoniae y las coccidiosis, así también como las
15 intoxicaciones provocadas por tricotecnos , debido a que
su factibilidad podría incidir directamente hacia una
disminución importante en los gastos asociados a procesos
de vacunación y de manera más importante aún,
disminuirían fuertemente las pérdidas productivas
20 asociadas a dichas enfermedades .

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Con el fin de alcanzar el objetivo de la presente
25 invención, se evaluó experimentalmente la capacidad de
una formulación que comprende inmunoglobulinas IgY
concentradas y específicas para neutralizar al virus de
PRRS, obtenida a partir de yema de huevo proveniente de
gallinas previamente hiperinmunizadas con una formulación
30 de vacuna emulsionada que comprende antígenos
provenientes de una o varias cepas del virus del PRRS,
aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que

consiste en partículas, micro-particular o nano-partículas de un polímero biodegradable .

Los inventores de la presente solicitud han logrado exitosamente el objetivo de la presente invención y han encontrado sorprendentemente que con antígenos de una o más cepas diferentes del virus del PRRS, cuidadosamente seleccionadas, se puede generar la esperada protección cruzada contra otras cepas del mismo virus e inducir la generación de inmunoglobulinas capaces de neutralizar un mayor número de virus de PRRS circulantes en el campo . La formulación de vacuna emulsionada, además debe incluir un aceite mineral ligero, como por ejemplo Marcol y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable para potenciar la vacunación, preferentemente empleando un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) , tal como Chitosan.

Con una formulación de vacuna emulsionada así preparada se inmuniza a las aves de postura para obtener, a través de la yema de huevo, inmunoglobulinas IgY neutralizantes contra agentes infecciosos o toxinas, las cuales tras un método de extracción, deslipidización y concentración, donde se utilizan cantidades mínimas, se obtiene finalmente una formulación concentrada de dichas inmunoglobulinas IgY capaces de lograr una protección inesperada de hasta aproximadamente el 100%, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas.

La invención presenta la ventaja adicional de estabilizar a la piara, parvada, rebaño o bancos, reduciendo la circulación de los agentes infecciosos. Así también, usando la formulación concentrada de origen

aviar de la invención como programa, se reduce la generación de subpoblaciones a la maternidad y al destete se logra retrasar la seroconversión de los animales de engorda .

5 A la fecha las inmunoglobulinas evaluadas han provenido de suero de mamífero y solamente han sido probadas por ejemplo en un modelo experimental desafiando con la misma cepa del virus con el que se vacunaron. Es decir, a diferencia de la presente invención, a las
10 vacunas del estado de la técnica se les ha probado únicamente la protección homologa (WO 02/067985) .

Además, la formulación concentrada de origen aviar de la invención, que comprende inmunoglobulinas IgY concentradas puede utilizarse en cualquier etapa
15 productiva de los animales sin generar efectos adversos o indeseables .

La formulación concentrada de origen aviar de la invención se encuentra altamente concentrada y protege contra desafíos más altos del agente infeccioso o
20 toxinas . Se cuenta con evidencias de protección contra desafíos de 10 a la siete (10,000,000), lo cual resulta muy superior a lo ya conocido en el estado de la técnica (WO 2007/061281 A2) .

Adicionalmente a lo anterior, mediante los procesos
25 de la presente invención se logra concentrar las inmunoglobulinas (IgY) neutralizantes contra los agentes infecciosos circulantes de campo o toxinas, de tal manera que se puede formular un concentrado donde se aplica únicamente 1 mi ó 3 mi por dosis, mientras que la
30 aplicación de las vacunas y productos del estado de la técnica, es hasta de 5 mi y más aún hasta 10 mi, e incluso más de 10 mi (WO 2007/061281 A2) .

La reducción en el volumen de aplicación es beneficiosa en varios aspectos. Primero porque la aplicación se hace sencilla, y segundo porque se reduce costos de producción y tercero, porque el transporte a
5 diferentes áreas ocupa menor espacio.

Las dosis de 1 ml o hasta 3 ml que se pueden lograr gracias a la formulación concentrada de inmunoglobulinas (IgY) de la presente invención, según la gravedad, obviamente, siguen un esquema de inmunización y, aún sin
10 ser propiamente una vacuna, puede funcionar como tal y controlar los animales infectados. La formulación concentrada de origen aviar de la invención entra dentro de la plataforma de inmunidad pasiva, porque contiene inmunoglobulinas neutralizantes contra agentes
15 infecciosos o toxinas .

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra los resultados de titulación por MNT de diferentes muestras de huevo colectado de aves inmunizadas con vacunas diferentes. El grupo A fue
25 vacunado con 2 vacunas elaboradas con aceite mineral cada una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de manera alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus
30 de PRRS y fue aplicada mensualmente. El grupo C fue vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente.

Estos resultados indican que los títulos de anticuerpos IgY producidos por la vacuna que contuvo seis cepas del virus PRRS, utilizando una formulación con marcol y chitosan resulta ser la que induce mayor
5 cantidad de anticuerpos contra el Síndrome Respiratorio y Reproductivo del cerdo.

La Figura 2 muestra el promedio del título de anticuerpos IgY en la yema utilizando tres tipos de formulaciones de vacuna. El grupo A fue vacunado con 2
10 vacunas elaboradas con aceite mineral cada una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de maneara alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue
15 aplicada mensualmente. El grupo C fue vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente .

La Figura 3 muestra el incremento en el título de
20 inmunoglobulinas después de aplicar el proceso de concentración. Se extrajeron inmunoglobulinas de yema, una parte se cuantificó por el método de MNT y el resto se sometió al proceso de concentración. El grupo A fue vacunado con 2 vacunas elaboradas con aceite minera cada
25 una de ellas conteniendo 3 cepas del virus de PRRS y aplicadas de maneara alternativa mensualmente. El grupo B fue vacunado con 1 vacuna elaborada con aceite mineral y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente. El grupo C fue
30 vacunado con una vacuna elaborada con marcol y chitosan, la cual contiene 6 cepas diferentes del virus de PRRS y fue aplicada mensualmente.

La Figura 4 muestra la disminución paulatina de los niveles de anticuerpos en las hembras del hato reproductor tras recibir la formulación concentrada.

En la figura 5 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16) .

La Figura 6 presenta una gráfica con los porcentajes de mortalidad de cada grupo evaluado, en donde se destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Inmunización de aves de postura para obtener
inmunoglobulinas __ (IgY) neutralizantes contra agentes
infecciosos o toxinas .

20

Se genera una vacuna emulsionada compuesta de antígenos para producir anticuerpos neutralizantes y no sólo contra una cepa de un determinado agente infeccioso o toxina, sino contra varias cepas circulantes de campo (vigilancia epidemiológica) o toxinas.

25

Lo anterior es muy importante para el caso de los virus de RNA, porque derivado de nuestra investigación se observó que no todas las cepas de un virus circulante pueden ser neutralizadas con anticuerpos generados a partir de los antígenos de una cepa en específico. Lo mismo sucede con las vacunas contra virus, pues cuando se vacuna con una cepa heteróloga, la protección es parcial.

30

En el caso de los microorganismos, se seleccionaron las cepas mediante pruebas de MNT (microneutralización) cruzada. Esta prueba consiste en probar el nivel de neutralización de las inmunoglobulinas, obtenidas
5 utilizando una vacuna con cepas definidas, contra los nuevos aislamientos del agente infeccioso. En nuestro trabajo en el laboratorio, hemos determinado que si el nuevo aislamiento presenta títulos menores a 1:160 en la MNT entonces se considera a esa cepa como candidata para
10 incluirse en una nueva vacuna. Por lo tanto, a la fecha nuestra vacuna ha contenido algunas cepas que confieren un espectro de neutralización amplio contra las cepas de los agentes infecciosos circulantes en México. Sin embargo, esto no limita a la invención y no debe entenderse que la invención se refiere a una vacuna que
15 únicamente incluye las cepas seleccionadas, porque las cepas del agente infeccioso podrán ir variando conforme se vaya monitoreando la circulación en campo de cepas nuevas, las cuales pueden incluirse posteriormente en la
20 vacuna para mantener la protección en los animales. También podría ampliarse el espectro de neutralización de la presente invención y adecuarse contra otras cepas de agentes infecciosos circulantes en otros países o en otras regiones .

25 Las cepas del agente infeccioso pueden ser aislamientos de campo obtenidos a partir de suero o tejido de animales enfermos. La base para la selección, como mencionamos, radica en la prueba de microneutralización cruzada entre las diferentes cepas
30 aisladas, con los Ig's contenidos en el producto y generados a partir de las cepas seleccionadas.

En el caso del virus de PRRS se pueden replicar en la línea celular MARC-145 y no se realizan más de cinco

pases del virus de la semilla de trabajo, para evitar la atenuación. Los antígenos seleccionados se inactivan con formol al 0.1% o por otro método descrito en el estado de la técnica. En nuestro laboratorio hemos determinado que
5 la mezcla de los antígenos debe tener cada uno un título mínimo de $DIE_{50\%} 10^4/ml$.

Considerando lo anterior, la formulación de la vacuna emulsionada para inmunizar a las aves comprende además de antígenos de una o varias cepas cuidadosamente
10 seleccionadas, un aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable para potenciar la vacunación, en particular se prefiere un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas
15 aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), tal como Chitosan.

La formulación de la vacuna de tipo agua en aceite, puede contener aproximadamente 50% a 70% y
20 preferentemente aproximadamente 60% a 67% de Marcol, aproximadamente 20% a 40% y preferentemente aproximadamente 28% a 35% de agua con antígenos del virus PRRS; aproximadamente 5% a 15% de cada cepa del virus PRRS seleccionada con base en los criterios antes
25 explicados, aproximadamente 2% a 5% de Monooleato de polioxietileno Sorbitan (Tween 80), aproximadamente de 2% a 8% de Sorbitán Monooleato de Sorbitan (Span 80) y un adyuvante como un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-
30 glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), particularmente 4 a 6% de chitosan. Para la preparación de la vacuna, cada componente se adiciona uno por uno bajo sistema de

agitación durante 1 a 5 minutos, adicionando al final el chitosan .

La vacuna se aplica a las aves de postura libres de patógenos, con 0.5 ml, 1 vez al mes, por la vía de administración subcutánea desde la semana 8 y hasta la 60 de edad, para finalmente obtener una formulación de inmunoglobulinas (IgY) neutralizantes de los agentes infecciosos de campo o toxinas a partir de la yema de huevo .

En particular, el nivel de anticuerpos para cada una de las cepas del agente infeccioso es evaluado por microneutralización (MNT) de las muestras de yema de huevo colectadas de la parvada vacunada. El título serológico mínimo debe cumplir el criterio de 1:160.

Tras la inmunización, se cosechan los huevos de las aves inmunizadas y los mismos se someten a un proceso de extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo.

Proceso de extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas IgY.

Se realizan los siguientes pasos para realizar la extracción y concentración de las inmunoglobulinas IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas a partir de la yema de huevo .

La yema de huevo se diluye 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante toda el día, preferentemente de 12 a 24 horas. Posteriormente, el sobrenadante se separa y se agrega 1 al 15% de hidroxipropilmetilcelulosaf talato (HPMCP) en proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja reposar por

lo menos 24 horas. La capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución es separada y la parte acuosa se filtra, luego se le adiciona PEG, preferentemente 8000, en una proporción del 5-30% P/V, se
5 mezcla y se deja reposar al menos durante 4 horas, pero de preferencia se deja toda la noche a 4°C. Después se centrifuga por 20 a 30 minutos y se retira el sobrenadante. La pastilla resultante se solubiliza con PBS IX o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del
10 volumen original.

Terapias con la formulación concentrada de
inmunoglobulinas IgY de la invención.

15

La formulación resultante del proceso de extracción, deslipidización y concentración de las inmunoglobulinas IgY neutralizantes de agentes infecciosos o toxinas, obtenida a partir de la yema de huevo de gallinas
20 previamente hiperinmunizadas con una vacuna emulsionada que comprende antígenos, un aceite mineral ligero y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable, tal como un polisacárido lineal compuesto
25 de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada) (Chitosan), puede comprender: aproximadamente 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas contra patógenos o toxinas de la
30 invención, preferentemente 1% de inmunoglobulinas IgY concentradas, aproximadamente 80% a 90% de agua y aproximadamente 0.001% a 0.03% de conservadores. La dosis de tratamiento de la formulación concentrada de la

invención puede ser de 1 mi y de 3 mi como máximo, la cual logra neutralizar las variedades de campo los agentes infecciosos o toxinas de la invención, ofreciendo inesperadamente una protección de hasta el 100% en
5 animales, además de regularizar el nivel de S/P en granjas ya infectadas, tal como se muestra más adelante.

Considerando lo descrito anteriormente, en una primera modalidad, la presente invención se refiere a una
10 formulación de vacuna emulsionada que comprende antígenos, un aceite mineral ligero, preferentemente Marcol y un adyuvante particulado que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable, tal como por ejemplo el
15 polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada), preferentemente Chitosan. Además, la formulación de vacuna de la presente invención, comprende
20 uno o más emulsionantes, tal como Monooleato de polioxietileno Sorbitan (Tween 80), Sorbitán Monooleato de Sorbitan (Span 80), o una mezcla de los mismos.

Los antígenos pueden provenir de una o varias cepas diferentes de uno o varios agentes infecciosos o de
25 toxinas, tales como por ejemplo virus, bacterias o protozoos, más particularmente del virus del PRRS, del virus de PED, del virus *White spot Syndrome Baculovirus Complex*, de *Rotavirus spp.* o de *Coronavirus spp.*, y más particularmente de los virus de PRRS que tienen una
30 secuencia de nucleótidos del gen ORF5 seleccionada del grupo que consiste de SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 3, SEQ. ID. NO: 4, SEQ. ID. NO: 5, SEQ. ID. NO: 6 y SEQ. ID. NO: 7, y también del virus de la Diarrea

Epidémica Porcina (DEP) . También los antígenos puede provenir de una o varias bacterias, tal como de *Salmonella* spp., de las seleccionadas del grupo que consiste en: *Staphylococcus aureus* , *Streptococcus*
5 *agalactiae*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium pyogenes* y *Mycoplasma bovis*, o también de *Actinobacillus pleuropneumoniae* . Los antígenos además pueden provenir de uno o varios protozoarios seleccionados del grupo que consiste en: *Eimeria tenella* , *Eimeria acervulina* y
10 *Eimeria maxima*, o de toxinas producidas por hongos, tales como tricotecenos y más particularmente de 4-deoxinivalenol (DON) . Más aun, los antígenos pueden provenir de una o varias cepas diferentes de uno o varios virus, una o varias bacterias o uno o varios
15 protozoarios, tal como por ejemplo de antígenos que provienen de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* , *Rotavirus* spp. y *Coronavirus* spp. En particular, los antígenos también pueden provenir del grupo que consiste de *Escherichia coli*, *Rotavirus*
20 spp. y *Coronavirus* spp.

La formulación de vacuna emulsionada de la invención puede contener cepas virales seleccionadas por tener un título serológico menor a 1:160, evaluado por microneutralización cruzada utilizando un pool de
25 inmunoglobulinas obtenidas con la vacuna en curso.

Asimismo, la formulación de vacuna emulsionada de la invención puede contener una mezcla de antígenos con títulos mayores a $\text{DIE}_{50\%} 10^4/\text{ml}$.

De acuerdo con el o los antígenos seleccionados,
30 la presente invención también se refiere al uso de la formulación de vacuna emulsionada en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y

Reproductivo (PRRS) en porcinos, el tratamiento de
Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos, el
tratamiento del síndrome de la mancha blanca en camarón,
el tratamiento de mastitis bovina, el tratamiento de
5 infecciones producidas por *Actinobacillus*
pleuropneumoniae en porcinos, el tratamiento de
coccidiosis en aves, el tratamiento de intoxicaciones
provocadas por tricotecenos, particularmente en donde el
tricoteceno es 4-deoxinivalenol (DON), respectivamente,
10 en donde la formulación de vacuna emulsionada es
administrable por la vía subcutánea a las aves de
postura.

En otra modalidad, la presente invención se refiere
a un proceso para la extracción y concentración de
15 inmunoglobulinas a partir de yema de huevo de gallinas
previamente hiperinmunizadas con la formulación de vacuna
de la presente invención, caracterizado por los
siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con
20 azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración
por lo menos durante 24 horas.

b) Se separa el sobrenadante y se agrega
hidroxipropilmetilcelulosaf talato (HPMCP) al 1-15% en
proporción de 0.25 ml por cada 100 ml de yema. Se deja
25 reposar por lo menos 24 horas.

c) Se separa la capa de lípidos que se forma en la
parte superior de la solución y se filtra la parte
acuosa.

d) Se adiciona PEG, preferente PEG 8000 en una
30 proporción del 5-30% P/V, se mezcla y se deja reposar al
menos durante 4 a 12 horas a 4°C.

e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita el
sobrenadante.

f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS IX o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original, mantener el pH en 7.

En una modalidad adicional, la presente invención se dirige a una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar obtenida por el proceso para extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas previamente hiperinmunizadas con la vacuna emulsionada de la invención. Dichas formulaciones concentradas de origen aviar de la invención puede comprender además aproximadamente de 70% a 85% de agua y/o aproximadamente de 0.001% a 0.03% de conservadores. En particular, la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY está caracterizada porque comprende 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY concentradas neutralizantes del virus que causa el PRRS.

Además, según el o los antígenos seleccionados, la presente invención también se refiere al uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS) en porcinos, la Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos, el síndrome de la mancha blanca en camarón, mastitis bovina, las infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos, la coccidiosis en aves y las intoxicaciones provocadas por tricotecenos, particularmente las provocadas por tricotecenos como 4-deoxinivalenol (DON), en donde el medicamento puede ser administrable por la vía de administración parenteral, preferentemente por la vía intramuscular o es administrable vía oral y con el alimento, según sea el caso.

Los siguientes ejemplos muestran los resultados de la aplicación de la formulación concentrada de la invención en porcinos. No obstante, dichos ejemplos son proporcionados con el fin de ilustración y no de
5 limitación.

EJEMPLO 1

Se elaboraron dos vacunas que contuvieron tres cepas cada una del virus PRRS, utilizando una formulación sin
10 marcol y sin chitosan. Estas vacunas se aplicaron a las aves de manera mensual y alternadas; es decir, un mes se administró una y al siguiente la otra y así sucesivamente .

Tras la inmunización, se cosecharon los huevos de
15 las aves inmunizadas y se sometieron a un proceso de extracción de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo, tal como antes fue descrito.

Como resultado de la inmunización anterior, se obtuvo una formulación con inmunoglobulinas IgY
20 neutralizantes de virus del PRRS, pero cuya concentración fue baja.

La figura 1 muestra los resultados de este experimento (grupo A), en los que se puede apreciar el bajo rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes
25 de virus del PRRS de la formulación previamente obtenida, la cual es incapaz de llevar a cabo un tratamiento eficiente en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, pues es necesario emplear volúmenes mayores a 5 mL y que proteja a títulos de 10^4 .
30 Además, este experimento resultó ser complicado y problemático por el manejo de dos vacunas.

EJEMPLO 2

Se elaboró una vacuna conteniendo seis cepas diferentes del virus PRRS, utilizando una formulación sin marcol y con chitosan, la cual fue administrada a las aves mediante un esquema de inmunización mensual.

Tras la inmunización, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y se sometieron a un proceso de extracción de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo, tal como antes fue descrito.

Como resultado de la inmunización anterior, el rendimiento mejoró con respecto al experimento del ejemplo 1, pero no fue suficiente (Ver figura 1, grupo B).

Como resultado de este experimento, se encontró que el rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS es inadecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo.

EJEMPLO 3

Se formuló nuevamente una vacuna, pero ahora utilizando Marcol como aceite mineral ligero y chitosan como adyuvante particulado. Esta vez, se incluyeron antígenos de 6 cepas del virus PRRS en una sola vacuna.

Tras la inmunización, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y se sometieron a un proceso de extracción de inmunoglobulinas a partir de la yema de huevo, tal como antes fue descrito.

Nuestros resultados indican que los títulos de anticuerpos se incrementan hasta 2 veces respecto a lo obtenido con la formulación del experimento del ejemplo 2 (ver figura 1, grupo c).

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de este experimento, en los que se puede apreciar que el rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS se incrementa significativamente cuando se
5 utiliza una formulación con marcol y chitosan, lo cual resulta adecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo.

10

EJEMPLO 4

En este ejemplo se analizó el producto terminado de inmunoglobulinas. Se inmunizaron aves de postura, se cosecharon los huevos de las aves inmunizadas y las yemas de huevo se sometieron a un proceso de extracción y
15 concentración de inmunoglobulinas, tal como antes fue descrito. Las vacunas con las que se inmunizaron a las parvadas fueron las mismas que se presentaron en los ejemplos 1 a 3, pero en este caso, se incrementó el tamaño del lote a 10,000 huevos por parvada.

20

Nuestros resultados indican que el proceso de concentración, descrito anteriormente, incrementa los títulos de anticuerpos respecto a lo obtenido sin dicho proceso. El incremento en la concentración va de 1.6 a 2.1 veces (figura 3). Como resultado de este experimento,
25 se encontró que el rendimiento de inmunoglobulinas IgY neutralizantes de virus del PRRS es adecuado para llevar a cabo un tratamiento efectivo en porcinos que padecen del Síndrome Respiratorio y Reproductivo, utilizando un volumen menor para alcanzar la protección.

30

EJEMPLO 5**Aplicación de inmunoglobulinas (tipo IgY) en las hembras del hato reproductor .**

5

Se realizó un seguimiento longitudinal de la presencia de anticuerpos contra el virus de PRRS mediante la evaluación de sueros de 30 cerdas seleccionadas aleatoriamente a partir de una granja de explotación de ciclo completo con 500 cerdas, situada en el occidente de la República Mexicana. Esta granja produce lechones negativos al virus de PRRS, que se contaminan a lo largo de la vida productiva.

El hato reproductor fue tratado con una aplicación de 1 ml de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, por vía intramuscular cada 4 meses y una repetición 15 días después . Posteriormente se realizaron aplicaciones semanales a los 70 y 85 días de gestación.

Las cerdas del pie de cria fueron monitoreadas de forma bimestral para determinar el movimiento viral. Se tomaron muestras de sangre de los mismos 30 animales seleccionados inicialmente . Para la evaluación, se utilizó la técnica de ELISA (IDEXX, PRRS X3), que es una manera indirecta para medir la efectividad del tratamiento con IgY concentradas. El kit mide los niveles de anticuerpos del tipo IgG que genera el cerdo en respuesta a una viremia . Por lo tanto, si el cerdo está infectado producirá anticuerpos del tipo IgG como respuesta y se obtendrán valores de S/P por arriba del punto de corte, pero si no hay viremia el kit arrojará valores S/P inferiores al punto de corte. El punto de corte de la ELISA fue de 0.4 S/P.

En la figura 4 se muestra que el tratamiento aplicado al hato reduce los niveles de anticuerpos de manera paulatina a medida que se realiza el monitoreo bimestral y por ende se demuestra que el virus de PRRS fue neutralizado por las inmunoglobulinas aplicadas (del tipo IgY), limitando de esta manera la infección. Es importante señalar que sorpresivamente nuestro producto neutralizó al virus de tal manera que al cabo de 6 meses ya no se registró una reinfección del virus de PRRS. Esto mismo se prueba porque se registró una diferencia sustancial en los parámetros productivos de granjas negativas y positivas .

EJEMPLO 6

15

Aplicación de inmunoglobulinas (IgY) concentradas en lechones

En el presente ejemplo se muestran los resultados de evaluación de disminución de la viremia en lechones clínicamente afectados por el virus de PRRS. Los lechones no presentaron viremia durante la etapa de maternidad (primeras 3 semanas). Sin embargo, hubo evidencia clínica de viremia alrededor de las 6-8 semanas de edad. Esto se comprobó mediante la técnica de PCR en tiempo real, en donde se generaron 5 pools de sueros de animales virémicos; cada pool integrado por sueros de 5 porcinos diferentes (un total de 25 porcinos evaluados) . Como se observa en la tabla, la carga viral alcanzó títulos entre

30 6.16×10^5 y 2.24×10^7 .

Identificación	Carga Viral inicial	Carga viral después del Tratamiento
Destete 6	6.16×10^5	NEGATIVO
Destete 6	4.98×10^6	NEGATIVO
Destete 7-8	5.54×10^4	NEGATIVO
Destete 7-8	2.24×10^7	NEGATIVO
Destete 7-8	1.21×10^7	NEGATIVO

Una vez que se confirmó la viremia, se les aplicó un tratamiento con la formulación concentrada de origen aviar de la invención. Se aplicó una dosis de 3 mL por vía intramuscular. Para evaluar la eficacia del tratamiento, se observaron los datos clínicos y además se cuantificó la cantidad de virus circulante en los porcinos.

Los resultados del monitoreo a los 10 días posteriores a la aplicación de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención evidenció que el 100% de las muestras fueron negativas a la presencia de material genético del virus PRRS en suero.

Con los resultados obtenidos, se demuestra que la aplicación de un programa con inmunoglobulinas en el pie de cría evita la circulación viral y puede neutralizar la viremia en lechones de destete con cargas de 10^7 partículas virales por mL.

20

EJEMPLO 7

El uso de inmunoglobulinas IgY concentradas reduce la mortalidad de lechones

25

La formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención fue aplicada a porcinos destetados y destinados para engorda. Durante todo el tiempo de producción se registró la mortalidad bajo
5 diferentes sistemas de tratamiento.

La granja en estudio se ubica en la región centro occidente de la república mexicana y con 1100 cerdas en su hato reproductor y una producción semanal de 500 lechones. La granja tiene antecedentes de infección
10 endémica de PRRS, aun cuando se han implementado varias estrategias de control. Se tiene un sistema de autoreemplazo, en el cual se considera la introducción de cerdas cada 4 meses. En el pie de cria se incluye la aplicación de la vacuna a virus vivo modificado contra
15 PRRS cada 3 meses.

En el presente ejemplo se hizo un monitoreo semanal y se calculó el porcentaje de mortalidad tanto en el destete (semanas 3 a 9) como en el periodo de engorda (semana 10 a 26).

20 Se compararon dos tratamientos. Uno basado en vacuna viva y otro con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención, además también se consideró un bloque control sin tratamiento. Cada tratamiento estuvo integrado por diferentes grupos
25 que fueron evaluados de manera independiente: los grupos del 01 al 06 corresponden a lechones tratados de forma convencional (vacuna viva) y los grupos del 07 al 16 fueron los que recibieron dos dosis de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la
30 invención, en tanto los grupos 17, 18 y 19 no fueron tratados.

Tipo de tratamiento	Descripción del tratamiento	Grupos que recibieron el tratamiento
Vacuna a virus vivo modificado	Aplicación de la vacuna a los 21 días de edad y 3 meses .	6, Del 01 al 06
Inmunoglobulinas Altamente Concentradas de Origen Aviar específicas para PRRS (tipo IgY)	Dos aplicaciones de 3 ml c/u, semana 1 y 10 después del destete .	10, Del 07 al 16
Control sin tratamiento	Sin tratamiento	3, Del 17 al 19

5

En la figura 5 se muestra el monitoreo de la mortalidad a partir de la semana 3 y hasta la 26. Los grupos que fueron tratados con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención se resaltan en un cuadro azul más intenso (grupos del 07 al 16) .

El porcentaje de mortalidad promedio de los grupos no tratados fue el más alto (25.06%), en seguida se ubica a los grupos que recibieron el tratamiento convencional (21.2% en promedio) y el mejor tratamiento fue el de la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de nuestra invención, donde se obtuvo un porcentaje promedio de mortalidad del 10.27%. Es decir, que con el uso de las inmunoglobulinas IgY se alcanza una supervivencia de casi el 90% de los animales tratados que

representa 10% más de lo alcanzado por el método de vacunación .

En la figura 6 se presenta una gráfica de los porcentajes de mortalidad acumulada de cada grupo evaluado, en donde se destacan aquéllos que fueron tratados con la formulación concentrada de origen aviar de la invención.

Los resultados del uso de inmunoglobulinas del tipo IgY concentradas muestran una reducción significativa en los porcentajes de mortalidad asociados al virus de PRRS . Aún más, se observó que el estado de salud y productividad de estos animales también mejoró, a diferencia de los grupos que recibieron la vacuna. Es importante señalar que esta es la primera vez que se evidencia el uso de inmunoglobulinas aviares para el tratamiento en lechones .

Estos resultados son muy significativos, pues el programa con la formulación de inmunoglobulinas IgY concentrada de origen aviar de la invención en lechones no sólo disminuye el porcentaje de mortalidad, sino que además brinda la posibilidad de obtener otras mejoras en los parámetros productivos .

Por lo anterior, se apreciará que aunque las modalidades específicas de la invención se han descrito en la presente para propósitos de ilustración, pueden hacerse varias modificaciones sin desviarse de la naturaleza y alcance de la invención. En consecuencia, la invención no está limitada excepto por las reivindicaciones anexas .

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de vacuna emulsionada que comprende: (i) antígenos, (ii) un aceite mineral ligero y
5 (iii) un adyuvante particulado que se selecciona del grupo que consiste en partículas, micro-partículas o nano-partículas de un polímero biodegradable.

2. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque
10 los antígenos provienen de una o varias cepas diferentes de uno o varios virus.

3. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el virus es el virus del PRRS.

15 4. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque las cepas aisladas del virus de PRRS tienen una secuencia de nucleótidos del gen ORF5 seleccionada del grupo que consiste de SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO:
20 3, SEQ. ID. NO: 4, SEQ. ID. NO: 5, SEQ. ID. NO: 6 y SEQ. ID. NO: 7.

5. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el virus es el virus de la Diarrea Epidémica Porcina
25 (DEP).

6. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque el virus es el virus *White spot Syndrome Baculovirus Complex*.

30 7. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque

los antígenos provienen de una o varias cepas diferentes de una o varias bacterias .

8. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque
5 los antígenos provienen de una o varias cepas diferentes de una o varias bacterias seleccionadas del grupo que consiste en: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium pyogenes* y *Mycoplasma bovis*.

10 9. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque los antígenos provienen de una o varias cepas diferentes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* .

15 10. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los antígenos provienen de una o varias cepas diferentes de uno o varios protozoarios .

20 11. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 10, caracterizada porque los antígenos provienen de una o varias cepas diferentes de uno o varios protozoarios seleccionados del grupo que consiste en: *Eimeria tenella*, *Eimeria acervulina* y *Eimeria maxima*.

25 12. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los antígenos provienen de toxinas producidas por hongos.

30 13. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los antígenos provienen de una mezcla de antígenos de una o varias cepas diferentes de uno o varios virus, una o varias bacterias o uno y varios protozoarios.

14. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los antígenos provienen de *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium perfringens*, *Rotavirus spp* y
5 *Coronavirus spp.*

15. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque los antígenos provienen de *Escherichia coli*, *Rotavirus spp.* y *Coronavirus spp.*

10 16. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque los antígenos provienen de cepas virales seleccionadas por tener un título serológico menor a 1:160, evaluado por microneutralización cruzada
15 utilizando un pool de inmunoglobulinas obtenidas con la vacuna en curso.

17. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizada porque contiene una mezcla de antígenos con
20 títulos mayores a $\text{DIE}_{50\%} 10^4/\text{ml}$.

18. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, caracterizada porque el aceite mineral ligero es Marcol.

25 19. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, caracterizada porque el adyuvante particulado es Chitosan.

30 20. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, caracterizada porque además comprende un agente emulsionante.

21. La formulación de vacuna emulsionada de conformidad con la reivindicación 20, caracterizada porque el agente emulsionante se selecciona del grupo que consiste en: Monooleato de polioxietileno Sorbitan (Tween 80), Sorbitán Monooleato de Sorbitan (Span 80) o una mezcla de los mismos.

22. Uso de la formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS) en porcinos.

23. Uso de la formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 5 en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento de Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos.

24. Uso de la formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 6 en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento del síndrome de la mancha blanca en camarón.

25. Uso de la formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 7 a 8 en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento de mastitis bovina .

26. Uso de la formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 7 y 9 en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento de infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos.

27. Uso de la formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1, 10 y 11 en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento de coccidiosis en aves.

28. Uso de la formulación de vacuna emulsionada de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 12 en la elaboración de una composición concentrada de inmunoglobulinas IgY útil para el tratamiento de intoxicaciones provocadas por tricotecenos .

29. El uso de conformidad con la reivindicación 28 en donde el tricoteceno es 4-deoxinivalenol (DON) .

30. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 29, en donde la formulación de vacuna emulsionada comprende Marcol como aceite mineral ligero .

31. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 30, en donde la formulación de vacuna emulsionada comprende Chitosan como adyuvante particulado.

32. El uso de conformidad con las reivindicaciones 1 a 31, en donde la formulación de vacuna emulsionada es administrable por la vía subcutánea a las aves de postura.

33. Un proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas hiperinmunizadas con la formulación de vacuna emulsionada según las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0.01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante todo el día.

b) Se separa el sobrenadante y se agrega
5 hidroxipropilmetilcelulosaf talato (HPMCP) del 1 al 15% en proporción de 0.25 mi por cada 100 mi de yema. Se deja reposar por lo menos 24 horas.

c) Se separa la capa de lipidos que se forma en la parte superior de la solución y se filtra la parte
10 acuosa

d) Se adiciona PEG en una proporción del 5 al 30% P/V, se mezcla y se deja reposar al menos durante 4 a 12 horas a 4°C.

e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita
15 el sobrenadante.

f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original .

34. El proceso para la extracción,
20 deslipidización y concentración de inmunoglobulinas de conformidad con la reivindicación 33, en donde la yema 1:4 ó 1:8 (sin la clara) diluida con azida de sodio al 0.01% en el paso (a), se almacena en refrigeración de 12 a 24 horas.

25 35. El proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas de conformidad con la reivindicación 33, en donde en el paso (d) se adiciona PEG8000 en una proporción del 5 al 30% P/V, se mezcla y se deja reposar al menos durante 4 a 12
30 horas a 4°C.

36. Una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar obtenida por el

proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35.

37. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque comprende de 0.8% a 5% de inmunoglobulinas IgY neutralizantes del virus que causa el PRRS.

38. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 37, caracterizada porque comprende 1% de inmunoglobulinas IgY neutralizantes del virus que causa el PRRS.

39. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, caracterizada porque además comprende de 70% a 85% de agua.

40. La formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 39, caracterizada porque además comprende de 0.001% a 0.03% de conservadores.

41. Uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 36 a 40 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del Síndrome Respiratorio y Reproductivo (PRRS) en porcinos.

42. Uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 36 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de Diarrea Epidémica Porcina (DEP) en porcinos.

43. Uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 36 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del síndrome de la mancha blanca en camarón.

44. Uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 36 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de mastitis bovina.

45. Uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 36 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infecciones producidas por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en porcinos.

46. Uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 36 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de coccidiosis en aves.

47. Uso de la formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar de conformidad con la reivindicación 36 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de intoxicaciones provocadas por tricotecenos .

48. El uso de conformidad con la reivindicación 47 en donde el tricoteceno es 4-deoxinivalenol (DON) .

49. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 41, 42, 44, 45, 47 y 48, en donde el medicamento es administrable por la vía de administración parenteral .

50. El uso de conformidad con la reivindicación 49, en donde el medicamento es administrable por la vía intramuscular.

51. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 43, y 46, en donde el medicamento es administrable vía oral y con el alimento.

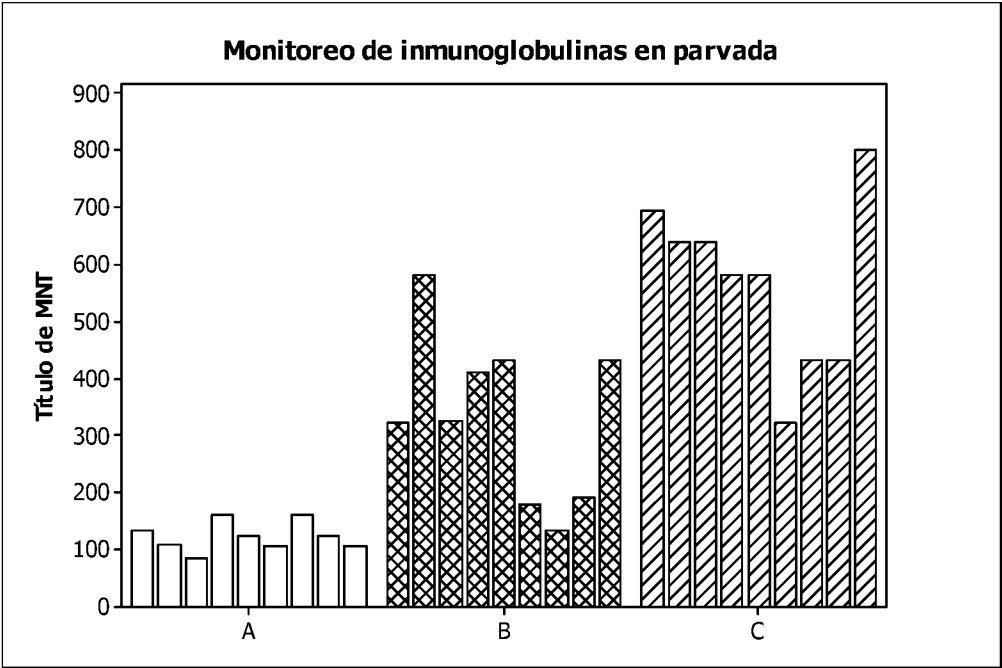


Figura 1

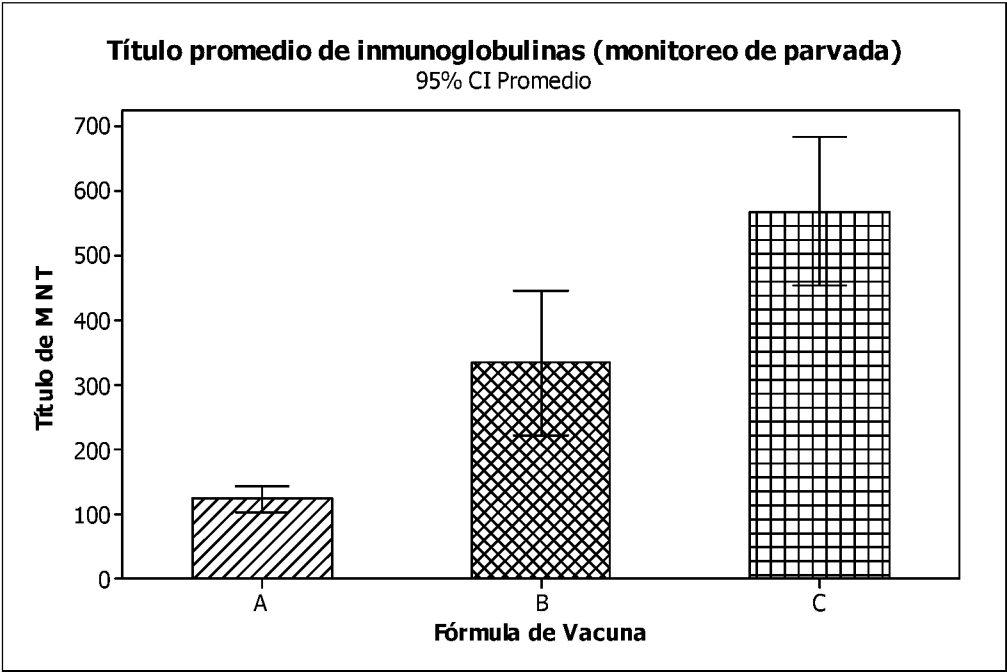


Figura 2

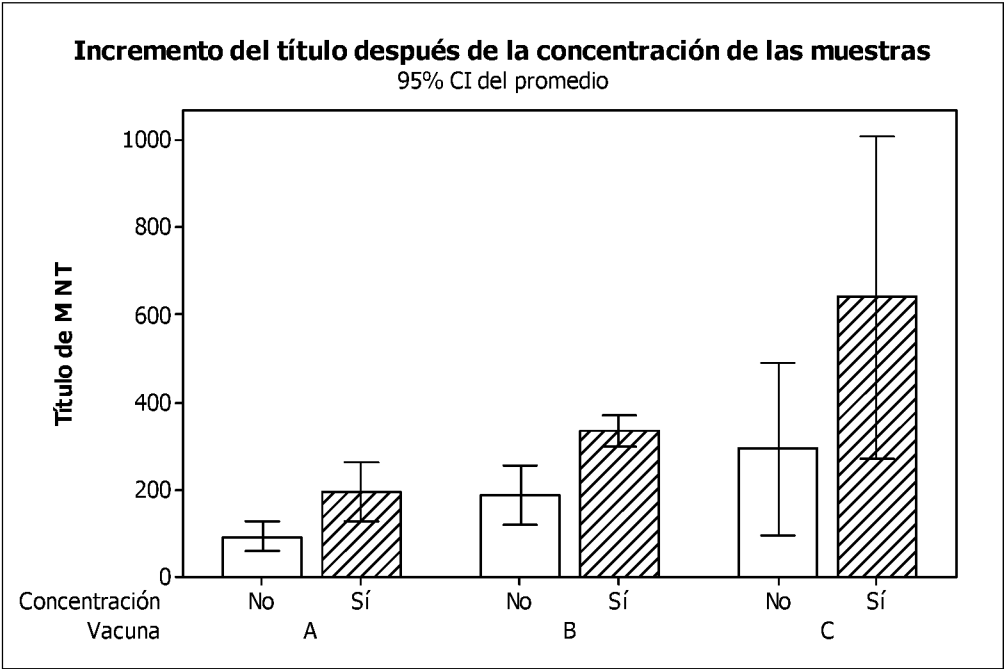


Figura 3

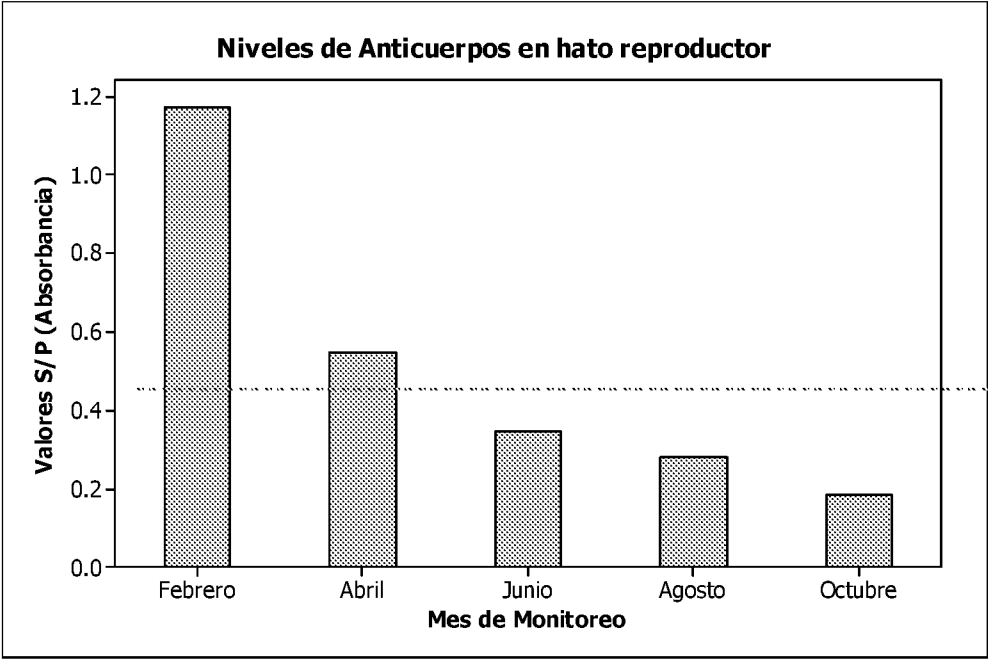


Figura 4

		MORTALIDAD POR GRUPO																														
		DESTETE								ENGORDA																TOTAL						
		3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	DEST	ENG	TOTAL				
																														100%		
DESTETADOS	GRUPOS																															
456	GPO 01	1	3	2	5	14	9	5	6	7	5	3	3	3	2	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	40	9%	33	7%	73	15.0	
443	GPO 02	1	2	3	2	4	6	3	1	1	0	0	1	1	2	1	4	5	2	1	2	5	4	10	2	25	6%	53	12%	78	17.6	
413	GPO 03	4	2	2	0	11	14	5	1	3	2	0	2	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	2	41	10%	25	6%	66	15.0
442	GPO 04	0	0	2	23	14	14	21	1	4	2	2	0	2	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	81	18%	15	3%	96	21.7
390	GPO 05	0	2	2	24	23	15	21	0	22	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	4	1	0	1	0	1	79	20%	35	9%	124	31.8
373	GPO 06	0	2	3	14	10	15	23	5	1	3	4	4	0	0	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	57	15%	28	8%	90	24.1
422	GPO 07	1	1	0	6	12	9	3	3	4	2	3	1	1	2	0	4	0	0	1	1	0	0	1	0	1	41	10%	28	7%	69	16.4
423	GPO 08	1	2	1	1	10	4	2	1	2	3	4	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	21	5%	17	4%	38	9.2
458	GPO 09	0	2	1	1	1	1	1	10	11	5	7	1	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1	0	2	10	2%	44	10%	54	11.8	
405	GPO 10	1	0	0	2	3	5	7	1	4	13	4	1	2	2	1	0	2	0	0	0	1	0	2	0	18	4%	35	9%	53	13.1	
427	GPO 11	0	2	0	2	4	1	1	0	6	4	3	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	2	0	0	10	2%	20	5%	30	7.0	
453	GPO 12	1	1	0	2	1	1	2	7	7	6	0	1	1	5	4	0	1	1	0	2	2	1	0	0	8	2%	38	8%	46	10.2	
490	GPO 13	1	0	2	4	1	0	6	5	1	0	0	1	3	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	16	3%	24	5%	40	8.1	
472	GPO 14	7	1	0	7	1	9	5	2	1	1	3	4	7	2	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	25	5%	21	4%	46	9.7	
599	GPO 15	0	5	2	9	7	0	9	4	1	3	2	2	0	0	1	0	2	2	0	0	0	0	2	1	40	6%	20	3%	60	8.6	
495	GPO 16	2	4	1	0	0	7	6	5	5	5	0	0	0	0	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	22	4%	20	4%	42	8.5	
465	GPO 17	0	0	13	20	8	12	13	8	9	1	2	0	4	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	75	16%	27	6%	102	21.9
419	GPO 18	1	0	3	19	19	30	12	5	3	12	4	3	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	84	20%	31	7%	115	27.4
432	GPO 19	4	5	10	15	0	18	10	16	6	9	5	5	4	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	76	18%	29	11%	125	28.9

Figura 5

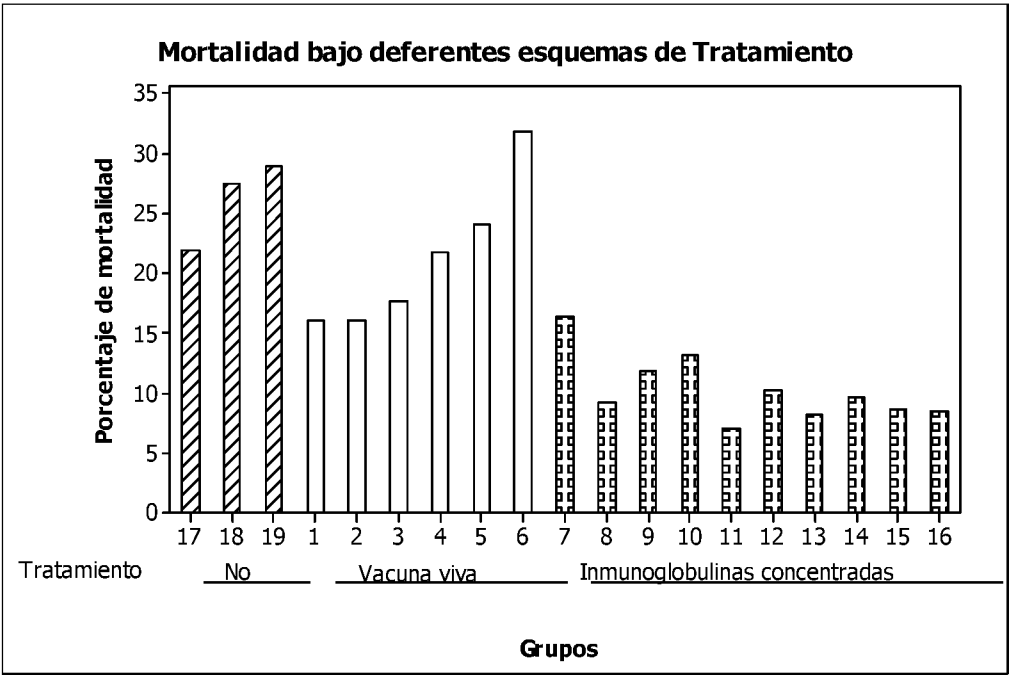


Figura 6

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2014/064028

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A6 1K39/395 A6 1K39/42 C07 K16/02 ADD.

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A6 1K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) Ep0 -I n t e r n a l , B I o S I S , C H E M A B S D a t a , E M B A S E , w p I D a t a

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X	US 2009/2388 16 A1 (LARS EN JANUS BEI ERH O L M [DK]) 24 septiembre 2009 (2009 -09 -24) párrafo [0252J - párrafo [0257] example 4 párrafo [0389] párrafo [035 1] - párrafo [0359] -----	1-32 , 36-42 , 46
X	DATABASE w p I Week 200938 Thomson Scientific, London , GB ; AN 2009 -J45395 XP00273889 1, & CN 10 1 428 145 A (BEI J I N G C E N T B I O L O G Y C O L T D) 13 Mayo 2009 (2009 -05 - 13) resumen ----- -/- .	1- 2 1 , 3 1 , 32

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

15 July 2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

24/07/20 15

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Mata Vi cente , Tere sa

N° de fax

N° de teléfono

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2014/064028

C (continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	PAULY DIANA ET AL: "IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation.", JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS : JOVE 2011 , no. 51, 2011 , - 2011 , XP002738892 , ISSN : 1940-087X Discusión -----	1-32
X	YOKOYAMA HIDEAKI ET AL: "A two-step procedure for purification of hen egg yolk immunoglobulin G: Utilization of hydroxypropylmethyl cellulose phosphate and synthetic affinity ligand gel (Avid AL)", POULTRY SCIENCE, vol . 72, no. 2, 1993 , Paginas 275-281 , XP002741982 , ISSN : 0032-5791 Procedura IB -----	36,39 , 49-51
A	US 4 357 272 A (POLSON ALFRED) 2 Noviembre 1982 (1982-11-02) columna: 7, línea 42 - línea 45 columna: 6, párrafo 3 -----	33-35

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/IB2014/064028

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

Ver hoja adicional

1. ☒ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- E-il El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones o grupos de invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Reivindicaciones 1-32

Una formulación de vacuna emulsionada que comprende: (i) antígenos, (ii) un aceite mineral ligero y (iii) un adyuvante particulado que se selecciona del grupo que consiste en partículas, micropartículas o nanopartículas de un polímero biodegradable. Uso de la formulación de vacuna emulsionada en la elaboración de una composición concentrada de IgY.

2. Reivindicaciones 33-51

Un proceso para la extracción, deslipidización y concentración de inmunoglobulinas a partir de yema de huevo proveniente de gallinas hiperinmunizadas con la formulación de vacuna emulsionada según las reivindicaciones 1 a 21, caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

a) Se diluye la yema 1:4 o 1:8 (sin la clara) con azida de sodio al 0,01 % y se almacena en refrigeración por lo menos durante 24 horas. b) Se separa el sobrenadante, se agrega HPMCP del 1 al 15% en proporción de 0,25 ml por cada 100 ml de yema y se deja reposar por lo menos 24 horas. c) Se separa la capa de lípidos que se forma en la parte superior de la solución y se filtra la parte acuosa. d) Se adiciona PEG en una proporción del 5 al 30% P/V, se mezcla y se deja reposar al menos durante 4 a 12 horas a 4°C. e) Se centrifuga por 20 a 30 minutos y se quita el sobrenadante. f) La pastilla resultante se solubiliza con PBS o buffer TRIS, a un volumen equivalente al 10% del volumen original. Una formulación concentrada de inmunoglobulinas IgY de origen aviar obtenida por dicho proceso y su uso en la elaboración de un medicamento.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/IB2014/064028

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2009238816	Al 24-09-2009	DK 2027158 T3	14-01-2013
		DK 201100184 UI	13-01-2012
		EP 2027158 AI	25-02-2009
		EP 2463306 AI	13-06-2012
		US 2009238816 AI	24-09-2009
		US 2015080267 AI	19-03-2015
		W0 2007124755 AI	08-11-2007

CN 101428145	A 13-05 -2009	NONE	

US 4357272	A 02-11 -1982	JP S54130995 A	11- 10- 1979
		US 4357272 A	02- 11- 1982

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/064028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61K39/42 C07K16/02
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal , BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/238816 AI (LARSEN JANUS BEI ERHOLM [DK]) 24 September 2009 (2009-09-24) paragraph [0252] - paragraph [0257] example 4 paragraph [0389] paragraph [[00335511]] - paragraph [0359] -----	1-32 , 36-42 , 46
X	DATABASE WPI Week 200938 Thomson Scientific, London, GB; AN 2009-J45395 XP002738891 , & CN 101 428 145 A (BEIJING CENT BIOLOGY CO LTD) 13 May 2009 (2009-05-13) abstract ----- -/- .	1-21 , 31 , 32



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) on which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 July 2015

Date of mailing of the international search report

24/07/2015

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mata Vi cente, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2014/064028

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAULY DIANA ET AL: "IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation.", JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS : JOVE 2011, no. 51, 2011, - 2011, XP002738892, ISSN: 1940-087X Discussion -----	1-32
X	YOKOYAMA HIDEAKI ET AL: "A two-step procedure for purification of hen egg yolk immunoglobulin G: Utilization of hydroxypropylmethyl cellulose phthalate and synthetic affinity ligand gel (Avid AL)", POULTRY SCIENCE, vol. 72, no. 2, 1993, pages 275-281, XP002741982, ISSN: 0032-5791 Procedure IB -----	36,39 , 49-51
A	US 4 357 272 A (POLSON ALFRED) 2 November 1982 (1982-11-02) column 7, line 42 - line 45 column 6, paragraph 3 -----	33-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2014/064028

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos. :

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos. :

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims : 1-32

An emulsified vaccine formulation comprising: (i) antigens, (ii) a light mineral oil and (iii) a particulate adjuvant selected from the group consisting of biodegradable polymer particles, micro-particles or nanoparticles. Use of the emulsified vaccine formulation in preparing a concentrated IgY formulation.

2. claims : 33-51

A process for immunoglobulins extraction, delipidation and concentration from egg yolks from hens hyperimmunized with the emulsified vaccine formulation of claims 1 to 21, wherein it comprises the following steps: a) The yolk is diluted 1:4 or 1:8 with 0.01% sodium azide and stored under refrigeration during at least 24h. b) The supernatant is separated, HPMCP is added at 1-15% in a 0.25 ml per each 100 ml of yolk ratio and it is allowed to rest during at least 24h. c) The lipid layer formed in the upper part is separated from the solution and the aqueous part is filtrated. d) PEG is added in a 5-30% P/V ratio, mixed and allowed to rest during at least 4-12 hours at 4°C. e) It is centrifuged during 20-30 minutes and the supernatant is removed, f) The resulting tablet is solubilized with PBS IX or TRIS buffer, at a volume equivalent to 10% of the original volume. An avian derived concentrated IgY immunoglobulins formulation obtained by said process and the use thereof to prepare a medicament.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2014/064028

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
US 2009238816	AI	24-09-2009	DK	2027158	T3	14-01-2013
			DK	201100184	UI	13-01-2012
			EP	2027158	AI	25-02-2009
			EP	2463306	AI	13-06-2012
			US	2009238816	AI	24-09-2009
			US	2015080267	AI	19-03-2015
			Wo	2007124755	AI	08-11-2007

CN 101428145	A	13-05-2009	NONE			

US 4357272	A	02-11-1982	JP	S54130995	A	11- 10- 1979
			US	4357272	A	02- 11- 1982
